

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 07 OCT 2003

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 37 639.5

Anmeldetag:

13. August 2002

Anmelder/Inhaber:

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Halle, Saale/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von virusanalogen
Partikeln durch in vitro-Assemblierung von
Kapsomeren oder von Kapsomeren, an die bio-
logisch aktive Makromoleküle gebunden sind, bei
gleichzeitiger Verpackung der Makromoleküle

IPC:

C 12 N 7/00

BEST AVAILABLE COPY

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Verfahren zur Herstellung von virusanalogen Partikeln durch in vitro-Assemblierung von Kapsomeren oder von Kapsomeren, an die biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, bei gleichzeitiger Verpackung der Makromoleküle

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro-Assemblierung von Kapsomeren oder von Kapsomeren, an die biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, zu virusanalogen Partikeln oder zur Verpackung biologisch aktiver Makromoleküle in diese virusanaloge Partikel während der in vitro-Assemblierung. Diese Komplexe stellen für die Gentherapie geeignete Vektoren dar. Sie ermöglichen es, biologisch aktive Makromoleküle in Zellen zu transduzieren, so dass diese dort funktionell sind. Als Kapsomere werden in diesem Fall natürlich vorkommende Virushüllproteine, rekombinant produzierte Virushüllproteine oder gentechnisch hergestellte Varianten von Virushüllproteinen bezeichnet.

Virusanaloge Partikel, im folgenden als VLP's abgekürzt, stellen eine aus einem oder mehreren Virushüllproteinen bestehende Virushülle dar. Sie können verschiedene Formen annehmen; im Fall der von Polyoma VP1 abgeleiteten VLP's etwa Hohlkugeln mit einem Durchmesser von ca. 40-50 nm, die aus 360 VP1 Molekülen, angeordnet in 72 Pentamere, aufgebaut sind. Neben dieser Art von VLP's kann Polyoma VP1 auch noch kleinere Formen sowie stäbchenförmige VLP's ausbilden (Salunke et al., 1989, Biophys. J. 56, 887-900). Die VLP's können durch die rekombinante Produktion der Kapsomere in Insektenzellen oder Hefe hergestellt werden. Bei dieser Produktion werden direkt VLP's isoliert. Die rekombinante Expression von Kapsomeren in Escherichia coli führt zur Gewinnung von nicht-assemblierten Kapsomeren, diese können in vitro zu VLP's assembliert werden. Dieser Assemblierungsprozess wird häufig in Gegenwart stabilisierender Salz wie Ammoniumsulfat durchgeführt. So erfolgt eine Assemblierung von Polyoma VP1 unter diesen Bedingungen zu homogen strukturierten VLP's. Der Einsatz erforderlicher hoher Konzentrationen dieses Salzes bei der Assemblierung resultiert in hohen Ionenstärken des Puffers, was eine Bindung

von Nukleinsäuren und anderen biologisch aktiven Makromolekülen an die Kapsomere beeinträchtigt. Daher ist Ammoniumsulfat ungeeignet für den Einsatz bei einer mit der Assemblierung von Kapsomeren, an die Makromoleküle gebunden sind, einhergehenden Verpackung von biologisch aktiven Makromolekülen.

Das Kapsomer des Polyomavirus VP1 zum Beispiel ist in der Lage, biologisch aktive Makromoleküle zu binden. Eine Bindungsstelle des Proteins für Nukleinsäuren ist in der N-terminalen Sequenz lokalisiert, die einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren enthält (Moreland et al., 1991, J. Virol. 65, 1168-1176). An diese Sequenz können auch andere Makromoleküle binden. Die Bindung von Polyoma VP1 an Plasmid-DNA verhindert die in vitro-Assemblierung zu VLP's. Daher beruhen die aktuellen Verfahren der Komplexbildung von Polyoma VP1 mit Plasmid-DNA auf der Wechselwirkung von bereits assemblierten VLP's mit DNA. Die beschriebene Prozedur führt zu einer Interaktion von VP1 und DNA, in der die DNA partiell gegen DNase-Verdau geschützt wird. Mit diesen Komplexen können Zellen sowohl in vitro als auch in vivo transduziert werden.

Die Effizienz der Komplexbildung von VLP's und DNA sowie der Grad des DNase-Schutzes erweist sich allerdings als sehr gering (Forstova et al., 1995, Hum. Gene Ther. 6, 297-306). Dies ist darauf zurückzuführen, daß Plasmid-DNA bei Inkubation mit VLP's nur in sehr geringem Maße in die VLP's aufgenommen werden, der Großteil der von VLP's gebundenen DNA verbleibt außerhalb der VLP's und liegt bestenfalls mit der Oberfläche der VLP's assoziiert vor, ohne verpackt zu sein. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Verpackung von Oligonukleotiden erhalten. In beiden Fällen konnte die Effizienz der Komplexbildung durch Absenken des pH-Wertes während der Komplexbildung auf pH 5 deutlich verbessert werden, dennoch führt dieses Verfahren nicht zu einer Verpackung der eingesetzten Nukleinsäuren.

Zur Verpackung speziell von Proteinen in VLP's wurde an den N-Terminus von Polyoma VP1 eine WW-Domäne fusioniert, die Prolin-reiche Sequenzen binden kann. Mit dieser Variante konnte GFP, an das eine Prolin-reiche Sequenz anfusioniert wurde, gebunden und in die VLP's verpackt werden (Schmidt et al., 2001, FASEB J. 15, 1646-1648).

Der Erfindung liegt das Problem zugrunde, ein neues Verfahren zur in vitro-Assemblierung von Kapsomeren in VLP's oder zur Verpackung biologisch aktiver Makromoleküle während der in vitro-Assemblierung von Kapsomeren zu entwickeln, bei dem eine hohe Effizienz der Assemblierung und ein hoher Verpackungsgrad für biologisch aktive Makromoleküle erzielt wird.

Gelöst wird das Problem dadurch, dass Kapsomere oder Kapsomere, an die mittels ionischer Interaktionen biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, in Gegenwart eines oxidierenden Redoxsystems und nicht-ionischer Stabilisatoren in einem Puffer mit einer Ionenstärke unter 250 mM assembliert werden. Als Makromoleküle kommen insbesondere, aber nicht ausschließlich, Nukleinsäuren wie doppelsträngige DNA, doppelsträngige RNA, einzelsträngige DNA und einzelsträngige RNA, PNA's, Proteine oder Peptide in Frage. Die Größe der zu verpackenden Nukleinsäure ist bevorzugt, aber nicht ausschließlich 10 - 5400 Basen, vorzugsweise 20 - 1000 Basen.

Als Kapsomere kommen Virushüllproteine in Betracht, die in vitro zu VLP's assembliert werden können. Dies ist beschrieben für Virushüllproteine bzw Kapsidproteine von z.B. Polyoma- und verwandten Viren, Papillomavirus, Poliovirus, Hepatitisvirus, Lentiviren, Rous Sarcoma Virus oder Adenoassoziiierter Virus.

Das Verfahren beruht auf dem überraschenden Effekt, dass nicht-ionische Stabilisatoren die Assemblierung von Kapsomeren zu VLP's begünstigen. Als nicht-ionische stabilisierende Substanzen können Zucker mit C3, C4, C5 und C6-Einheiten dienen wie etwa Glycerin, Trehalose, Fructose oder Sorbitol, aber auch Disaccharide wie Saccharose oder Galaktose und Oligosaccharide wie Amylose oder Amylopektin.

Alternativ zu Zuckern können als Stabilisator auch Polyole wie Ethylenglykol oder Polyethylenglycol verschiedener Kettenlängen eingesetzt werden.

Die nicht-ionische Substanz wird dem Puffer in Konzentrationen von 5-50 % (w/v) zugesetzt, vorzugsweise im Konzentrationsbereich von 15-30 % (w/v).

Kapsomere oder Kapsomere mit gebundenen Makromolekülen werden in einem Konzentrationsbereich von 50 µg/ml – 5 mg/ml zu VLP's assembliert, vorzugsweise von 0.25 – 2 mg/ml, bei einem pH von pH 7 – 8.5 und Temperaturen zwischen 15 und 30°C vorzugsweise pH 7.2 – 7.5 und einer Temperatur von 20 – 25°C. Als Puffersubstanzen können beispielsweise Tris, Hepes und Phosphat dienen, bevorzugt in Konzentrationen von 10 – 100 mM.

Die Assemblierung wird unter oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Dies kann die Oxidation durch molekularen Sauerstoff beinhalten oder bevorzugt die Oxidation mit Hilfe eines Redoxsystems aus oxidierten und reduzierten thiolhaltigen Substanzen wie reduziertes und oxidiertes Glutathion, Cystein/Cystin, Cysteamin/Cystamin, reduziertes/oxidiertes β -Mercaptoethanol oder aromatische thiolhaltige Substanzen. Diese werden bevorzugt als Gemisch von oxidiert zu reduzierter Substanz in einem Verhältnis von 1:10 bis 10:1 oder durch ausschließliche Zugabe der oxidierenden Substanz eingesetzt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Assemblierung von Kapsomeren erfolgt das Inkontaktbringen der zu assemblierenden Kapsomeren oder der Kapsomeren, an die

biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, mit dem Assemblierungspuffer, indem die Kapsomere mit dem Assemblierungspuffer verdünnt und/oder dialysiert werden. Grundsätzlich muß eine Umpufferung der Kapsomeren in den Assemblierungspuffer gewährleistet sein.

Die Verpackung biologisch aktiver Makromoleküle während der Assemblierung erfolgt vorzugsweise durch Inkubation der Makromoleküle mit den Kapsomeren. Die Proteinkonzentration liegt dabei im Bereich von 0.05 – 5 mg/ml, vorzugsweise bei 0.25 – 2 mg/ml.

Die an die Kapsomere gebundenen Makromoleküle werden bei der Assemblierung in die resultierenden VLP's mit hoher Effizienz verpackt. Dies betrifft sowohl die Menge an verpackten Makromolekülen pro VLP als auch den relativen Anteil an VLP's, in die Makromoleküle verpackt wurden. Zur Überprüfung der Verpackung biologisch aktiver Makromoleküle in VLP's werden die nicht-verpackten Makromoleküle mit Hilfe von DNasen, RNasen oder Proteasen verdaut und der verpackte und somit vor Abbau geschützte Anteil mittels Agarose-Gelelektrophorese oder Chromatographie quantifiziert werden. Es ist dabei besonders darauf zu achten, dass auch Makromoleküle, die unspezifisch mit den VLP's assoziiert vorliegen, abgebaut werden. Dies ist dadurch zu analysieren, daß die Effizienz der Verpackung in Abhängigkeit der eingesetzten DNase-, RNase- bzw Protease-Konzentration bestimmt wird.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben. Dabei wird auf folgende Abbildungen Bezug genommen:

Abbildung 1:

Assemblierung von Polyoma VP1 zu virusanalogen Partikeln in vitro

Abbildung 2:

Verpackung von DNA durch in vitro-Assemblierung von VP1

Abbildung 3:

Bindung von doppelsträngiger DNA an VP1

Abbildung 4:

Quantifizierung der dsDNA Bindung an VP1

Abbildung 5:

Einfluß der Ionenstärke auf die Bindung von dsDNA

Abbildung 6:

Bindung von einzelsträngiger DNA an VP1

Abbildung 7:

Bindung von einzelsträngiger RNA an VP1

Beispiel 1: Assemblierung von Polyoma VP1 zu VLP's in vitro

Polyoma VP1 wurde bei 20°C für 2 Tage dialysiert gegen 20 mM Tris, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 25 % Sorbitol (w/v), 0,5 mM GSH, 5 mM GSSG. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg/ml. Die Bildung der VLP's wurde anschließend überprüft mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie. Zur analytischen Ultrazentrifugation wurde die Probe bei 20°C und 20 000 rpm in einem AnTi50-Rotor zentrifugiert. Alle 10 Minuten wurde die Verteilung der VLP's in der Meßzelle durch Scannen der Probe bei 280 nm gemessen. Die hieraus ermittelte Sedimentation des Proteins weist nach, dass VP1 quantitativ zu VLP's assembliert ist.

Für die elektronenmikroskopische Analyse wurden 10 µl der Proteinlösung auf einem Formvar und Kohle-beschichteten Kupfergitter adsorbiert, mehrfach mit Wasser gewaschen und anschließend mit 2 % Uranylacetat gefärbt.

Abbildung 1A zeigt die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit mittels analytischer Ultrazentrifugation. Die Abbildung 1B zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der VLP's.

Beispiel 2: Verpackung von DNA durch in vitro-Assemblierung von VP1

Zur Assemblierung zu VLP's unter gleichzeitiger Verpackung von dsDNA, wurden 1,98 µM pentameres VP1 (0,42 mg/ml) mit 8,42 nM dsDNA der Länge von 100 bp, 184 bp bzw. 300 bp für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Zur Ausbildung der VLP's wurden diese Ansätze gegen Assemblierungspuffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% Glycerol (v/v), 25% D-Sorbitol (w/v), 2 mM CaCl₂, 4,5 mM GSSG, 0,5 mM GSH, pH 7,4) für 48 h bei 24 °C dialysiert.

Um die Verpackung von DNA in die erhaltenen VLP's nachzuweisen wurden die Proben zunächst 24 h bei 8°C gegen einen Sorbitol-freien Puffer dialysiert (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% Glycerol (v/v), 1 mM CaCl₂, pH 7,4). 200 µl dieser Probe wurden dann einem DNase-Verdau unterzogen (400 Units Benzonase der Firma Merck), um nicht verpackte

DNA-Fragmente abzubauen. Dazu wurden 5 mM Mg Cl₂ und 400 U Benzonase (Merck) zugesetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. In Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass dadurch freie DNA, sowie an Pentamer oder unspezifisch an VLP's gebundene DNA-Fragmente vollständig abbaut werden. Um die Benzonase zu inaktivieren und die DNA-Fragmente in den Capsiden frei zu legen, wurden 50 µl eines stop-mixes (0,5 M NaH₂PO₄, 0,5 M EDTA, 1 M DTT, pH 6,0) zugegeben und für 30 min bei 25°C inkubiert. Zur Denaturierung wurde die Proben anschließend bei 95°C für 15 min aufgeköcht. Zur Isolierung der DNA Fragmente wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließend eine Aufkonzentrierung mittels GFXTMPCR Kit durchgeführt. Durch Agarosegel-Elektrophorese (2% Agarose) und anschließende Ethidiumbromid-Färbung konnten die verpackten Fragmente dargestellt werden.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der hier beschriebenen DNA-Verpackung. Es wurden 100 bp, 180 bp und 300 bp dsDNA Fragment verpackt. Als Kontrolle diente eine nicht assemblierte Pentamer/DNA Probe. In den Spuren 4, 7 und 10 sind die Ansätze unter nativen Bedingungen dargestellt. Die Spuren 5, 8 und 11 unter denaturierten Bedingungen. Die Spuren 6, 9 und 12 zeigen Proben der aufkonzentrierten DNA nach Benzonase-Verdau Prozedur, d.h. in wtVP1 Capside verpackte DNA.

Beispiel 3: Nachweis der Bindung doppelsträngiger DNA (dsDNA) an VP1

Zum Nachweis an pentamerem Polyoma VP1 gebundener dsDNA wurde ein Gel shift Assay verwendet. 10 µg VP1 wurden mit 0.5 µg DNA einer 1kb oder 100 bp Leiter der Firma NEB bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Glycerin versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (1.8% Agarose) und Ethidiumbromid-Färbung analysiert.

Abbildung 3 zeigt das Laufverhalten der 1kb-Leiter dsDNA in Anwesenheit (Spur 1) und Abwesenheit von VP1 (Spur 2). Ebenso ist das Laufverhalten der 100bp-Leiter dsDNA in Anwesenheit (Spur 3) und Abwesenheit von VP1 (Spur 4) dargestellt. In beiden Fällen wird deutlich, dass die Bindung der DNA an Polyoma VP1 ihr Laufverhalten verändert.

Beispiel 4: Quantifizierung der Bindung von dsDNA an Polyoma VP1

Zur Quantifizierung der DNA-Bindung wurde die Methode der Fluoreszenzpolarisation eingesetzt. 23 nM eines Rhodamine-gelabelten DNA-Fragmentes von 184 bp Länge wurde mit VP1 titriert. Nach jeder Zugabe des Proteins zu der DNA wurde die Probe für 10 Minuten bei 20°C inkubiert und anschließend das Polarisationssignal gemessen. Hierzu wurde die Fluoreszenz bei 587 nm angeregt und die Emission bei 604 nm detektiert.

Abbildung 4 zeigt die Änderung des Polarisationssignals der gelabelten DNA mit steigender VP1-Konzentration (*). Diese Abhängigkeit lässt sich mathematisch beschreiben als Bildung eines VP1-DNA-Komplexes mit einer 1:1 Stöchiometrie und einer Dissoziationskonstante von $K_d = 103 \text{ nM}$ (-). (A) Lineare Auftragung. (B) Doppelt-reziproke Auftragung.

Beispiel 5: Einfluß der Ionenstärke auf die Bindung von dsDNA

175 nM pentameres Polyoma VP1, gelöst in 50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, wurde für 30 Minuten bei 20°C mit 250 nM Plasmid-DNA bei unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl inkubiert. Anschließend wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation die Menge an DNA-gebundenem VP1 bestimmt. Hierzu wurden die Proben bei 40 000 rpm, 20°C zentrifugiert und in 10-minütigem Abstand durch Messung der Absorption der Proben bei 230 nm das Sedimentationsverhalten des freien und gebundenen Proteins bestimmt.

Abbildung 5 zeigt den Anteil an DNA-gebundenem VP1 in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration des Puffers. Es wird deutlich, dass bei NaCl-Konzentrationen oberhalb von 80 mM die Bindung von VP1 an DNA kooperativ unterdrückt wird.

Beispiel 6: Nachweis der Bindung einzelsträngiger DNA (ssDNA) an VP1

Zum Nachweis an pentameres Polyoma VP1 gebundener ssDNA wurde ein Gel shift Assay verwendet. 10 µg VP1 wurden mit 2 µg ϕ X174 virion DNA der Firma NEB bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Glycerin versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (0.7 % Agarose) und Ethidiumbromid-Färbung analysiert.

Abbildung 6 zeigt das Laufverhalten der ϕ X174 Virion DNA in Anwesenheit (Spur 1) und Abwesenheit von VP1 (Spur 2,3). Spur 4 stellt einen Molekulargewichtsstandard dar. Es wird deutlich, dass die Bindung der DNA an Polyoma VP1 ihr Laufverhalten verändert.

Beispiel 7: Nachweis der Bindung von einzelsträngiger RNA (ssRNA) an VP1

Zum Nachweis an pentameres Polyoma VP1 gebundener ssRNA wurde ein Gel shift Assay verwendet. 10 µg VP1, welches zuvor für 10 Minuten mit SUPERaseIn Rnase inhibitor der Firma Ambion versetzt wurde, wurden mit 1.5 µg der RNA-Leiter der Firma NEB bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Glycerin versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose) und Ethidiumbromid-Färbung analysiert.

Abbildung 7 zeigt das Laufverhalten der RNA-Molekulargewichtsleiter in Anwesenheit (Spur 1) und Abwesenheit von VP1 (Spur 2,3). Es wird deutlich, dass die Bindung der RNA an Polyoma VP1 ihr Laufverhalten verändert.

11

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von virusanalogen Partikeln durch in vitro-Assemblierung von Kapsomeren oder Assemblierung von Kapsomeren, an deren geladene Aminosäuren biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, bei gleichzeitiger Verpackung der Makromoleküle in Gegenwart nicht-ionischer Stabilisatoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapsomere oder Kapsomere, an die biologisch aktive Makromoleküle gebunden sind, in einem Puffer einer Ionenstärke <250 mM in Gegenwart eines oxidierenden Redoxsystems assembliert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als biologisch aktive Makromoleküle dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA, PNA, Ribozyme, DNAzyme, RNAi, Peptide- oder Proteine-codierende DNA, Peptide oder Proteine verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,

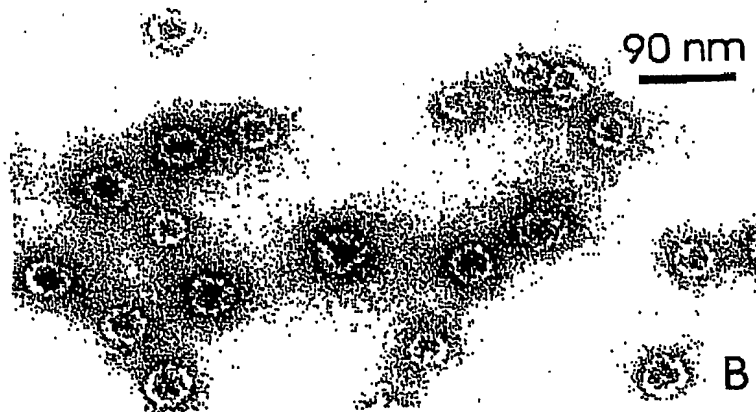
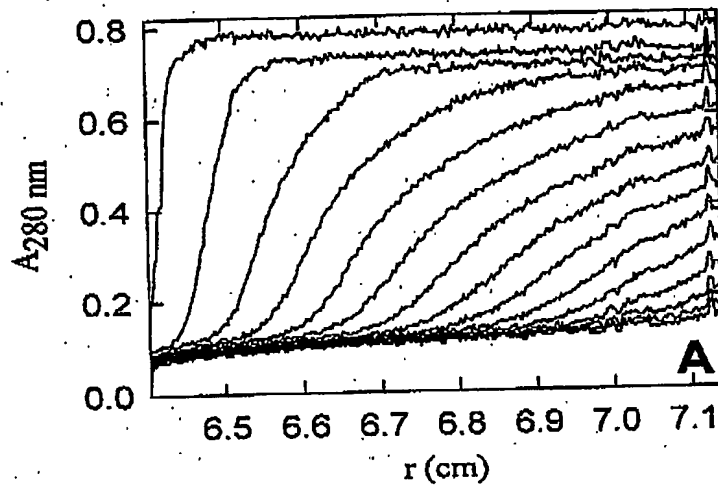
dass als Stabilisatoren Zuckerverbindungen der Klassen der C3-, C4-, C5-, C6-Verbindungen als Monosaccharide oder Oligo- bzw Polysaccharide oder andere Polyole wie Ethylenglykol oder Polyethylenglykol eingesetzt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet,

dass als oxidierendes Redoxsystem thiolhaltige Substanzen in ihrer reduzierten und oxidierten Form verwendet werden.

Abbildung 1



117

Abbildung 3

1 2 3 4

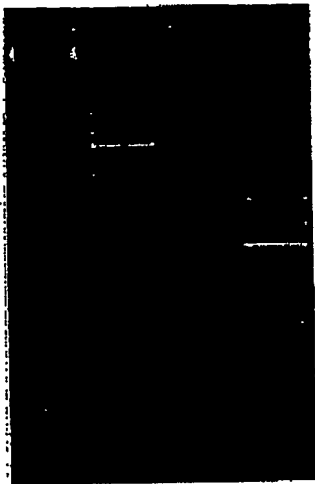
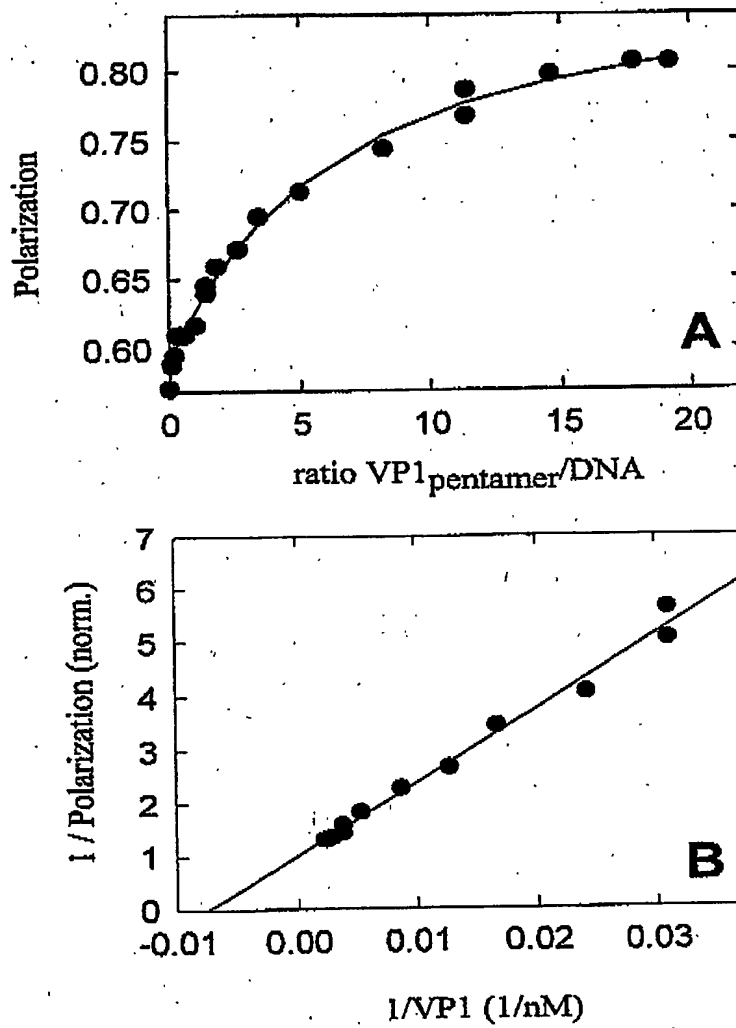
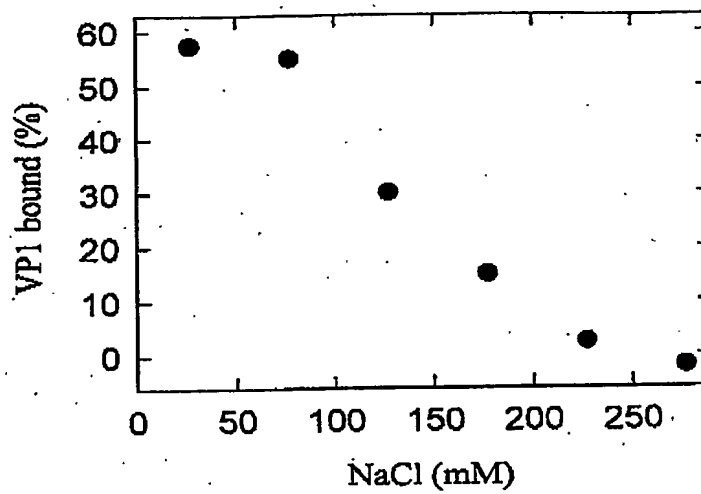


Abbildung 4



19

Abbildung 5



dl

Abbildung 6

1 2 3 4

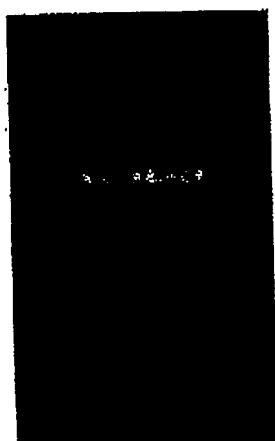
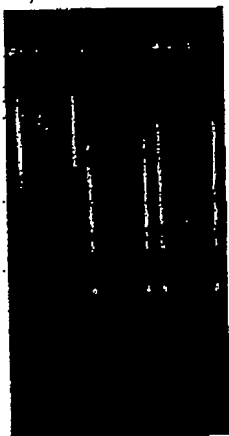


Abbildung 7

1 2 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.